

10/562063

PCT/JP2004/009084

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.06.2004

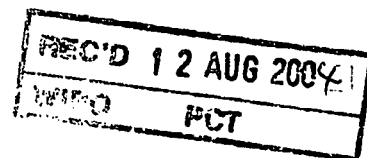
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 6月22日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-202699
[ST. 10/C]: [JP2003-202699]

出 願 人
Applicant(s): 早出 広司

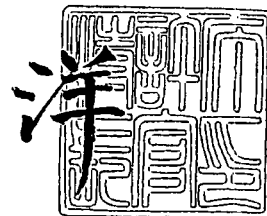


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3064669

【書類名】 特許願

【整理番号】 TUAT030623

【特記事項】

【提出日】 平成15年 6月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区南 1-13-16

 【氏名】 早出 広司

【特許出願人】

 【識別番号】 596153357

 【氏名又は名称】 早出 広司

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 凝集抑制シヌクレイン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 凝集形成能の抑制された変異ヒト α シヌクレイン

【請求項 2】 以下に挙げるアミノ酸位置の少なくとも 1 箇所のアミノ酸置換を含有する、変異ヒト α シヌクレイン遺伝子によってコードされている α シヌクレイン

68 番目のグリシン

69 番目のアラニン

70 番目のバリン

71 番目のバリン

72 番目のトレオニン

【請求項 3】 以下に挙げるアミノ酸置換の少なくとも 1 つを含有する、変異ヒト α シヌクレイン遺伝子によってコードされている α シヌクレイン

68 番目のグリシンをトレオニンまたはバリン

69 番目のアラニンをトレオニンまたはバリン

70 番目のバリンをトレオニンまたはプロリンまたはフェニルアラニン

71 番目のバリンをトレオニン

72 番目のトレオニンをバリン

【請求項 4】 請求項 1～3 に記載の変異ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子

【請求項 5】 請求項 4 に記載の遺伝子を導入した組み換えプラスミド。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の組み換えプラスミドにより形質転換された形質転換体。

【請求項 7】 (a) 請求項 4 に記載の遺伝子を調製する。

(b) 請求項 4 に記載の遺伝子をプラスミドに導入して組み換えプラスミドを調製する。

(c) (b) の組み換えプラスミドを用いて宿主を形質転換して形質転換体を調製する。および

(d) (c) の形質転換体を培養して請求項 1-3 記載の変異型ヒト α シヌクレインを産生させる。

以上の (a) ~ (d) の工程からなる変異型ヒト α シヌクレインの製造方法
組み換えプラスミドにより形質転換された形質転換体

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なヒト α シヌクレイン変異体に関する。

【0002】

【従来の技術】

α シヌクレインは 140 残基からなる熱に安定な蛋白質である。パーキンソン病患者脳 *の* Lewy 小体 *に* α シヌクレイン凝集物の蓄積がみられる事から、多くの神経変性疾患と同様、異常蛋白質の蓄積と神経細胞死との関連性が注目されている。 α シヌクレインは生体内では特定の立体構造をとらず、native unfolded protein family に属するとされている。

【0003】

α シヌクレインは一次構造上 3 つの領域に分けられ、その内中央領域を構成する 35 アミノ酸残基が、アルツハイマー病患者脳に見られる老人斑の第二の構成成分 NAC (Non-amyloid β component of Alzheimer's disease amyloid) であり、 β シート形成能が高く、凝集に特に深く関わる領域である事実が示されてきた。(Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Proc. Natl Acad Sci U S A. 1993; 90 (23): 11282-6., Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T., Biochemistry. 1995; 34 (32): 10139-45., Han H, Weinreb PH, Lansbury PT Jr. Chem Biol. 1995 (3): 163-9.)

【0004】

また、遺伝性点変異によりシヌクレインの凝集が促進される事が示唆されている (Linda Narhi, Stephen J. Wood, Shirley Steavenson, Yijia Jiang, Gay May Wu, Dan Anafi, Stephen A. Kaufman, Francis Martin, Karen Sitney, Paul Denis, Jean-Claude Louis, Jette Wypych, Anja Leona Biere, and Martin Citron, J. Biol. Chem., 1999; 274: 9843-9846., Rochet J-C, Conway K. A, Lansbury P. T, Biochemistry (2000) 39, 10619-626., Conway K. A, Harper J. D, Lansbury P. T, Nature Medicine (1998) 4, 1318-1320., Li J., Uversky V. N, Fink A. L, Biochemistry (2001) 40, 11604-613)。しかし、これまで系統的な変異 α シヌクレイン構築に基づく蛋白質科学的解析による同分子の凝集・線維化機構の解明は行われていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、凝集形成能の抑制された変異ヒト α シヌクレインを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、シヌクレインの凝集抑制効果を有するアミノ酸残基を種々検討した結果、凝集抑制効果を示すヒトシヌクレイン変異体を発見することに成功して本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は凝集形成能の抑制された変異ヒト α シヌクレインである。

【0008】

本発明はまた以下に挙げるアミノ酸位置の少なくとも1箇所のアミノ酸置換を含

有する、変異 α シヌクレイン遺伝子によってコードされている α シヌクレインである。

68番目のグリシン

69番目のアラニン

70番目のバリン

71番目のバリン

72番目のトレオニン

【0009】

本発明はさらに以下に挙げるアミノ酸置換の少なくとも1つを含有する、変異 α シヌクレイン遺伝子によってコードされている α シヌクレインである。

68番目のグリシンをトレオニンまたはバリン

69番目のアラニンをトレオニンまたはバリン

70番目のバリンをトレオニンまたはプロリンまたはフェニルアラニン

71番目のバリンをトレオニン

72番目のトレオニンをバリン

【0010】

また本発明は【0007】～【0009】に記載の変異ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子である。

【0011】

また本発明は【0010】に記載の遺伝子を導入した組み換えプラスミドである。

【0012】

また本発明は【0011】に記載の組み換えプラスミドにより形質転換された形質転換体である。

【0013】また本発明は (a) 請求項4に記載の遺伝子を調製する。

(b) 請求項4に記載の遺伝子をプラスミドに導入して組み換えプラスミドを調製する。

(e) (b) の組み換えプラスミドを用いて宿主を形質転換して形質転換体を調製する。および

(f) (c) の形質転換体を培養して請求項1-3記載の変異型ヒト α シヌクレインを産生させる。

以上の(a)～(d)の工程からなる変異型ヒト α シヌクレインの製造方法である。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の変異型ヒト α シヌクレインの調製法としては、野生型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子から遺伝子工学的手法を用いて行われる。

【0015】

これにはまず部位特異的変異法をもちいて野生型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子の変異目的部位の塩基配列を、目的とするアミノ酸残基に対応する塩基配列に変更して、変異型のヒト α シヌクレイン遺伝子を調製する。この部位特異的変異法は、原型の遺伝子DNAが組み込まれたプラスミドの一本鎖DNAを鋳型にして変異させようとする塩基配列を含む合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして変異型の遺伝子を合成するものであり、各種市販キットを用いて合成することができる(TAKARA Mutan express Kmなど)。

【0016】

本発明においては、野生型のヒト α シヌクレイン遺伝子の一本鎖とアニーリング可能であるが置換しようとする目的部位に対応する塩基配列が相違するオリゴヌクレオチドを化学合成し、この合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、かつ該野生型のヒト α シヌクレイン遺伝子が組み込まれたプラスミドの一本鎖DNAを鋳型として変異型のヒト α シヌクレイン遺伝子を合成するものである。

【0017】

次いで、変異型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子は発現ベクター系に挿入して発現用宿主ベクター系を構築する。本発明において用いられる宿主としては、例えば大腸菌、酵母、枯草菌などが挙げられるが特にこれらに限定されるものではない。

【0018】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0019】

実施例1

変異ヒト α シヌクレイン遺伝子の作成

ヒト α シヌクレイン遺伝子のクローニング

大腸菌発現ベクターとしてpTYB1を利用した。NdeIサイトをデザインしたプライマーと、KpnIサイトとインテインの構造遺伝子の塩基配列を一部含むようにデザインしたプライマーを用いて、cDNAライブラリーHuman Bone Marrowに対してPCRを行い、ヒト由来 α シヌクレインの構造遺伝子を増幅した。PCRの反応条件はDenature: 95°C (1min)、Annealing: 55°C (1min)、Extension: 72°C (1min)で35サイクル行った。PCR産物をアガロースゲルで電気泳動にかけた後、ジーンクリーンIIキットを用いてDNAを精製した。これをpGEM-Tにサブクローニングした。このプラスミドを大腸菌DH5 α -MCRに形質転換し、LB/アンピシリン (100 μ g/ml) /IPTG (0.5mM) /X-Gal (80 μ g/ml)のプレートにてカラーセクションを行った。得られたホワイトコロニーを培養後、プラスミドを抽出し、DNAシーケンスの解析を行った。 α シヌクレインの構造遺伝子の挿入が確認できたプラスミドを持つコロニーを再び培養し、抽出したプラスミドをNdeI、KpnIで制限酵素消化した。得られたDNA断片を上記同様に精製した。これを同様の制限酵素で調製した発現ベクターpTYB1にクローニングし、 α シヌクレインのC末端にインテイン~キチン結合ドメインがつくような融合蛋白質を発現させるためのベクター、pTYB1/ α -synを構築した。

PCR forwardプライマー

5' -CGC CAT ATG GAT GTA TTC ATG
AAA GGA CTT TCA AAG G-3'

PCR reverseプライマー

5' -GGT ACC CTT GGC AAA GCA GGC

TTC AGG TTC GTA GTC TTG ATA-3'

【0019】

このプラスミドを大腸菌DH5 α -MCRに形質転換、培養後、プラスミドを抽出し、DNAシーケンスの解析を行い変異の入っていないことを確認した。

【0020】

部位特異的変異導入

クローニングベクターpGEM-Tに α シヌクレイン遺伝子を挿入したプラスミドに対し、NcoIおよびPstIサイトをデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、 α シヌクレイン遺伝子断片を増幅した。増幅断片をTAクローニングした後、NcoIおよびPstIによる制限酵素消化により切り出し、同様に処理した発現用ベクターpTrc99AにライゲーションさせpTrc99A/ α synを作成した。このプラスミドに対し、HindIII-NdeIおよびKpnIサイトをデザインしたプライマーを用いてPCRを行い α シヌクレイン遺伝子断片を増幅した。増幅断片をTAクローニングした後、HindIIIおよびKpnIによる制限酵素消化により切り出し同様に処理した変異導入用ベクターpKF19kとライゲーションさせpKF19k/ α synを大腸菌DH5 α に形質転換後抽出し、遺伝子配列を確認後、TAKARA Mutan Super Express Kmキットを用いて α シヌクレイン遺伝子に変異導入をおこなった。その後大腸菌MV1184株に形質転換し、変異導入をシーケンス解析により確認した。

PCR forwardプライマー1:NcoIサイトをデザインしたプライマー

5' -CCA TGG ATG TAT TCA TGA AAG
GAC TTT CAA AGG CCA-3'

PCR reverseプライマー2:PstIサイトをデザインしたプライマー

5' -CCT GCA GTA TTT CTT AGG CTT
CAG GTT CGT AGT CTT G-3'

PCR forwardプライマー3:HindIII-NdeIサイトをデ

ザインしたプライマー

5' -CCAAGCTTCATAGGATGTATTCATGAAA
GGACTTT-3'

PCR reverseプライマー4: KpnIサイトをデザインしたプライ
マー

5' -GGT ACC CTT GGC AAA GCA GGC
TTC AGG TTC GTA GTC TTG ATA-3'

変異導入用オリゴヌクレオチド

G68T 5' -CAAATGTTGGAACAGCAGTGGTGAC-3'

G68V 5' -CAAATGTTGGAGTGGCAGTGGTGAC-3'

A69T 5' -GTTGGAGGAACAGTGGTGACGGG-3'

A69V 5' -GTTGGAGGAGTGGTGGTGACGGG-3'

V70T 5' -GGAGGAGCAACAGTGACGGGTG 3'

V70P 5' -GGAGGAGCACCTGTGACGGGTG 3'

V70F 5' -GGAGGAGCATTGTGACGGGTG- 3'

V70T, V71T

5' -CAAATGTTGGAGGAGCAACAACAACGGGTGTGA
CAGACAG- 3'

T72V 5' -GAGCAGTGGTGGTGGGTGTGACAG- 3'

【0021】

変異 α シヌクレイン生産用ベクターの構築

pKF19k/変異 α synのそれぞれをNdeIおよびKpnIにて制限酵素
消化し、同様に処理したインテイン融合発現ベクターpTYB1とライゲーショ
ンさせ各種pTYB1/変異 α synプラスミドを構築し、野生型と同様に大腸
菌DH5 α -MCRに形質転換した。

【0022】

実施例2

変異シヌクレインの製造

坂口フラスコを用い、450mlのLB培地（アンピシリン終濃度100 μ g

／ml) で37℃、一晚振とう培養したpTYB1／変異 α -synをもつ大腸菌ER2566をファーマンター中のLB培地(7L、エイノール(消泡剤) 1ml、を含む)に植菌した。エアレーション7L/minで、37℃で培養を開始し、OD₆₀₀が0.5~0.8に達した段階で終濃度0.3mMとなるようにIPTGを添加して、インティン〜キチン結合ドメイン融合 α シヌクレインの発現を誘導した。誘導開始後、温度を15℃に下げ、さらに16時間培養を行った。培養した菌体を遠心分離(5000g、4℃、10分)で集菌し、さらに得られた菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。

【0023】

精製方法

培養後、集菌、洗浄して得られた菌体を20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 50mM NaClに懸濁後、フレンチプレス(110MPa)で破碎し遠心分離(20,000×g, 4℃, 30分)を行った。あらかじめ20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 500mM NaClで平衡化しておいたキチンカラム(volume; 約10ml)に、遠心後得られた上清を流した。その後、20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 1M NaCl, 0.1%Tween20をカラムの10倍量使い、未吸着タンパクを洗い流した。続いて20mM Tris-HCl (pH7.4)を30ml流しカラムの塩濃度を下げ、20mM Tris-HCl (pH7.4), 50mM DTTを30ml流した状態で、4℃下に16時間放置してinteinの自己分解反応をさせた。その後、20mM Tris-HCl (pH7.4)を30ml流し、得られたサンプルを20mM Tris-HCl (pH7.4)に対して三回透析を行い、最後に非還元SDS-PAGEにより精製の確認を行った。

【0024】

実施例3

CDスペクトルによる α シヌクレインの構造変化の観測

精製された α シヌクレインを約100 μ g/mlになるように調製して、温度変化における α シヌクレインの構造変化をCDスペクトル測定により観察した。温

度変化は3-90℃で、低い温度から順に3℃、15℃、25℃、40℃、60℃、90℃にてスペクトルの測定を行った。また各温度において任意の時間に複数回スペクトラムを測定し、その温度における熱が十分 α シヌクレインに伝わり、構造状態が飽和していることを確認した。そののちに、蛋白質溶液由来のCDスペクトラムとして決定した。この蛋白質溶液由来のCDスペクトルから、蛋白質が溶解している緩衝液(20mM Tris-HCl (pH7.4), 50mM NaCl)由来のCDスペクトルを差し引き、コンピュータプログラムによりスムージングを行った。その結果、変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して凝集が抑制されていた。

【0025】

実施例4

蛍光プローブによる構造変化の観測

精製された α シヌクレインを約100 μ g/mlになるように調製して、温度変化における α シヌクレインの構造変化を20 μ MチオフラビンT, または50 μ M 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸(ANS)を加えチオフラビンTの場合はEx440nm, Em450-550nm、ANSの場合はEx380nm, Em400-600nmでの蛍光スペクル測定により観察した。温度変化は3-90℃で、低い温度から順に3℃、15℃、25℃、40℃、60℃、90℃にてスペクトルの測定を行った。また各温度において任意の時間に複数回スペクトラムを測定し、その温度における熱が十分 α シヌクレインに伝わり、構造状態が飽和していることを確認した。そののちに、蛋白質溶液由来の蛍光スペクトラムとして決定した。この蛋白質溶液由来の蛍光スペクトルから、蛋白質が溶解している緩衝液(20mM Tris-HCl (pH7.4), 50mM NaCl)由来の蛍光スペクトルを差し引き、コンピュータプログラムによりスムージングを行った。その結果、変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して凝集が抑制されていた。

【0026】

【発明の効果】

本発明により凝集形成能の抑制された変異ヒト α シヌクレインおよびその遺

伝子を製造することが可能となった。これにより、パーキンソン氏病病因の検討、遺伝子治療法開発研究への応用が可能となった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

凝集形成能の抑制された変異ヒト α シヌクレインを提供する。

【解決手段】

変異ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターにより微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、変異ヒト α シヌクレインを製造する。

【効果】 製造された変異ヒト α シヌクレインは凝集形成能が抑制されており、これをもちいてパーキンソン氏病病因の検討、遺伝子治療法開発研究への応用が可能となった。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-202699
受付番号	20301170139
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成15年 8月12日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年 6月22日

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-202699
受付番号	20301170139
書類名	特許願
担当官	岩谷 貴志郎 7746
作成日	平成16年 6月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年 6月22日

特願2003-202699

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日
[変更理由]

1996年10月 1日

新規登録

住所
氏名

東京都目黒区南1-13-16

早出 広司